

24. 5. 2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2 0 0 3 年 4 月 7 日

出 願 番 号  
Application Number: 特 願 2 0 0 3 - 1 3 5 1 4 1  
[ST. 10/C]: [ J P 2 0 0 3 - 1 3 5 1 4 1 ]

REC'D 15 JUL 2004

WIPO

PCT

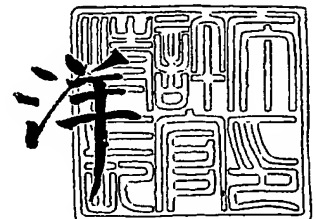
出 願 人  
Applicant(s): 日 本 製 紙 株 式 会 社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 7 月 1 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



【書類名】 特許願

【整理番号】 PA-4982083

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/63

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都北区王子 5 丁目 2 1 番 1 号 日本製紙株式会社技術研究所内

    【氏名】 河岡 明義

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都北区王子 5 丁目 2 1 番 1 号 日本製紙株式会社技術研究所内

    【氏名】 南藤 和也

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都北区王子 5 丁目 2 1 番 1 号 日本製紙株式会社技術研究所内

    【氏名】 海老沼 宏安

【特許出願人】

    【識別番号】 000183484

    【氏名又は名称】 日本製紙株式会社

    【代表者】 三好 孝彦

【代理人】

    【識別番号】 100074572

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 河澄 和夫

    【電話番号】 03-3911-5499

【選任した代理人】

【識別番号】 100126169

【弁理士】

【氏名又は名称】 小田 淳子

【電話番号】 03-3911-5499

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012553

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9704982

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規ベクター及びこのベクターを用いて行う植物形質転換体の  
作出方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の構成単位 A 及び B を、同一 DNA 分子上に又は異なる DNA 分子上に配したベクターであって、プロモーター 1 として、少なくともカルス及び目的遺伝子を発現させようとする植物組織において活性を示すプロモーター、プロモーター 2 として、少なくともカルスにおいて活性を示すプロモーター、並びに、プロモーター 3 として、少なくともプロモーター 1 及びプロモーター 2 が活性を示さない植物組織において活性を示すプロモーターを有することを特徴とする、ベクター。

A. プロモーター 1、発現抑制配列、並びに、プロモーター 1 により発現が促進され、かつ、前記発現抑制配列により発現が抑制される目的遺伝子からなる DNA 配列。

B. プロモーター 2、プロモーター 2 により発現が促進されて前記発現抑制配列による発現抑制を機能せしめる発現抑制遺伝子、プロモーター 3、前記発現抑制配列、並びに、プロモーター 3 により発現が促進され、かつ、前記発現抑制配列により発現が抑制される脱離反応触媒酵素遺伝子からなり、該脱離反応触媒酵素遺伝子の発現により脱離する DNA 配列。

【請求項 2】 プロモーター 1 が、少なくとも花芽分裂細胞及びカルスにおいて活性を示し、芽の分裂細胞において活性を示さないプロモーター、プロモーター 2 が、少なくともカルスにおいて活性を示し、芽の分裂細胞において活性を示さないプロモーター、プロモーター 3 が、少なくとも芽の分裂細胞において活性を示すプロモーター、更に、目的遺伝子が細胞機能阻害遺伝子であることを特徴とする、請求項 1 に記載のベクター。

【請求項 3】 プロモーター 1 及びプロモーター 2 が、シロイヌナズナの PISTILLATA (PI)、APETALA1 (AP1)、APETALA2 (AP2)、APETALA3 (AP3)、AGAMOUS (AG)、LEAFY (LFY)、SEPALLATA3 (SEP3) 遺伝子の発現を制御するプロ

モーター又はタバコTA29プロモーターであることを特徴とする、請求項1又は2に記載のベクター。

【請求項4】 プロモーター3が、植物のヒストンH3、H4プロモーター、シロイヌナズナのSHOOT MERISTEMLESS (STM)、CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC) 遺伝子の発現を制御するプロモーターであることを特徴とする、請求項1、2又は3に記載のベクター。

【請求項5】 目的遺伝子が、サイトトキシンをコードする遺伝子であることを特徴とする、請求項1、2、3又は4に記載のベクター。

【請求項6】 サイトトキシンをコードする遺伝子が、Bax、RNase、プロテアーゼ又はDAMメチラーゼをコードする遺伝子であることを特徴とする、請求項5に記載のベクター。

【請求項7】 発現抑制配列がオペレーター配列、発現抑制遺伝子がオペレーター配列結合タンパク質をコードする遺伝子であることを特徴とする、請求項1、2、3、4、5又は6に記載のベクター。

【請求項8】 オペレーター配列が、lacI遺伝子や酵母のGAL4遺伝子から転写活性化領域を欠失させたものであることを特徴とする、請求項7に記載のベクター。

【請求項9】 脱離反応触媒酵素遺伝子が、部位特異的組換え系の組換え酵素遺伝子であって、構造単位Bが、この組換え酵素遺伝子が認識し、互いに同じ方向を向いている2つの認識配列に挟まれていることを特徴とする、請求項1、2、3、4、5、6、7又は8に記載のベクター。

【請求項10】 請求項1に記載のベクターを用いて植物細胞に遺伝子導入を行い、この植物細胞を培養し、カルスを経由して植物組織又は器官を再分化させることを特徴とする、目的遺伝子のカルスにおける発現を抑制して行う、植物形質転換体の作出方法。

【請求項11】 請求項2、3、4、5、6、7、8又は9に記載のベクターを用いて植物細胞への遺伝子導入を行い、この植物細胞を培養してカルスを増殖させ、次いで、このカルスから芽を再分化させて植物体を作成することを特徴とする、不稔植物の作出方法。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は新規なベクター、及び、このベクターを用いて行う植物形質転換体の作出方法に関する。

**【0002】****【従来の技術】**

一般的に、組換え植物を作成する際、目的の遺伝子を目的の組織あるいは器官で発現させるには、その組織あるいは器官特異的なプロモーターの制御下に目的遺伝子を連結したDNA構造物を作成し、植物の細胞に導入した後、カルスを経由して植物体を形成させる。しかし、この目的遺伝子の発現を制御するプロモーターは、ほぼ全てがカルスで活性化する。これは、カルスは脱分化した細胞の塊であり、組織特異的な発現制御から逸脱したもので、細胞の分裂活性が高く、組織あるいは器官特異性を司る転写調節因子が作用しないためと考えられる。このため、目的の遺伝子がカルス細胞で過剰に発現し、芽への再分化が損われ、形質転換植物が得られない現象が知られている。

**【0003】**

また、近年スギ花粉などによる花粉症が社会問題化しており、花粉飛散を防止する目的で、スギ等の雄性不稔化についての研究が進められている。一方、組換え植物を野外で生育させる場合、花粉の飛散が問題となっている。これは、組換え遺伝子を含む花粉が野性種と交配する可能性があるためである。特に樹木の場合、植物体が大型化することから、組換え遺伝子の環境への拡散が懸念されている。組換え植物を不稔化しておけば、この危険を回避することができる。さらに、花卉園芸においては種子ができると植勢が低下し、花咲きが悪くなったりするため、不稔形質を導入し、開花期間を延長させようとする試みもなされている。

**【0004】**

このように不稔植物に対する社会的な需要は非常に大きなものである。従来、不稔植物の作製は、主として交配による不稔形質の導入法や遺伝子導入法によって行われてきた。交配による導入法は、特別な装置や施設が必要なく、簡易な手

段で不稔植物を作製できるというメリットがあるが、その反面、不稔形質が導入できる植物種に限られるというデメリットがある。現在、不稔性形質を持つ個体が確認されている栽培植物としては、イネ、コムギ、トウモロコシ、ナタネなどが知られているが、これらの植物と交配可能な植物でなければ、この方法によっては不稔植物を作製することができない。一方、遺伝子導入法は、交配法とは異なり、広範な植物種に適用が可能であるというメリットがある。現在までのところ、遺伝子導入法により不稔性の付与に成功した例としては、トウモロコシ、キャベツ、ブロッコリー、レタス、メロンなどが知られている。

#### 【0005】

##### 【特許文献1】

特開 2002-125496 号公報

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

目的遺伝子のカルスでの過剰発現については、未だに、有効な解決法が見出されていない。

#### 【0007】

一方、遺伝子導入法による不稔化植物の作成については、交配法に比べて種々の点で優れていることが知られ、例えば、国際公開第 8910396 号には、バーナーゼ遺伝子を蒴組織のタペタム細胞に特異的な発現プロモーターの下流に連結して作成した雄性不稔遺伝子を植物に導入し、雄性不稔植物を得る技術が報告されている。しかし、バーナーゼ遺伝子を雄性不稔遺伝子として使用した場合には、雄性不稔形質転換体が、好ましくない形質を示す場合がしばしば観察されている。国際公開第 9626283 号にはイネにおけるこのような問題が述べられているが、イネだけでなくレタスにおいても同様な現象が報告されている (Scientia Horticulturae, 55, 125-139:1993; Arlette Reymaerts, Hilde Van de Wiele, Greta De Sutter, Jan Janssens: Engineered genes for fertility control and their application in hybrid seed

production)。その報告によるとタバコ由来の葯特異的プロモーター (TA29) とバーナーゼ遺伝子を用いた雄性不稔遺伝子をレタスに導入した場合、活力の低下した植物体が現れる。このような現象の正確な原因は解明されていないが、たとえば、いわゆる遺伝子導入部位の「位置効果」の影響がそのメカニズムとして想定されている (国際公開第 9626283 号)。すなわち、雄性不稔遺伝子が目的とする部位である葯でのみ発現すれば希望する雄性不稔植物が作成できるが、当該遺伝子の導入部位近傍に存在する内在性エンハンサー等の発現調節因子の影響で葯組織以外でもバーナーゼ遺伝子ごく微量発現する可能性がある。このような場合、酵素活性が強力であるために、上述した好ましくない形質が現れることが考えられる。

#### 【0008】

また、遺伝子導入による不稔化植物を作成する過程においても、脱分化組織であるカルスを作成した後、不定芽を分化させ、組換え植物を作成するのが一般的である。この際、鍵となる花芽分裂細胞特異的なプロモーターがカルスで働くことが問題となる。細胞機能阻害遺伝子がカルス細胞中で発現し、形質転換された細胞が増殖しないという現象が見られた。

#### 【0009】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは鋭意検討を重ねた結果、以下の構成単位 A 及び B を、同一 DNA 分子上に又は異なる DNA 分子上に配したベクターであって、プロモーター 1 として、少なくともカルス及び目的遺伝子を発現させようとする植物組織において活性を示すプロモーター、プロモーター 2 として、少なくともカルスにおいて活性を示すプロモーター、並びに、プロモーター 3 として、少なくともプロモーター 1 及びプロモーター 2 が活性を示さない植物組織において活性を示すプロモーターを有することを特徴とするベクターにより、上記課題が解決されることを見出し、本願発明を完成した。

#### 【0010】

A. プロモーター 1、発現抑制配列、並びに、プロモーター 1 により発現が促進され、かつ、前記発現抑制配列により発現が抑制される目的遺伝子からなる DN



A配列。

【0011】

B. プロモーター 2、プロモーター 2 により発現が促進されて前記発現抑制配列による発現抑制を機能せしめる発現抑制遺伝子、プロモーター 3、前記発現抑制配列、並びに、プロモーター 3 により発現が促進され、かつ、前記発現抑制配列により発現が抑制される脱離反応触媒酵素遺伝子からなり、該脱離反応触媒酵素遺伝子の発現により脱離する DNA 配列。

【0012】

【発明の実施の形態】

以下に本願発明を詳細に説明する。

【0013】

(1) 本発明のベクター

本発明のベクターは、図 1 に示すように大きく 2 つの構成単位から成る。1 つは構成単位 A であって、プロモーター 1、発現抑制配列、並びに、プロモーター 1 により発現が促進され、かつ、前記発現抑制配列により発現が抑制される目的遺伝子からなる DNA 配列である。もう一つは構成単位 B であって、プロモーター 2、プロモーター 2 により発現が促進されて前記発現抑制配列による発現抑制を機能せしめる発現抑制遺伝子、プロモーター 3、前記発現抑制配列、並びに、プロモーター 3 により発現が促進され、かつ、前記発現抑制配列により発現が抑制される脱離反応触媒酵素遺伝子からなり、該脱離反応触媒酵素遺伝子の発現により脱離する DNA 配列である。

【0014】

構成単位 A 及び B は、植物染色体 DNA に組込みが可能なバイナリーベクターの同一 T-DNA 領域に配するのが望ましいが、異なる T-DNA 領域に配してもよい。さらに、これらは、同一 DNA 分子上にあっても、異なる DNA 分子上にあっても構わない。即ち、本発明においてベクターとは、必ずしも一つの DNA 分子からなるものには限定されず、2 つの DNA 分子かなるものをも意味している。

【0015】

次にそれぞれの構成遺伝子について説明する。

#### 【0016】

ここでプロモーター1は、少なくともカルス及び目的遺伝子を発現させようとする植物組織において活性を示し、その制御下にある目的遺伝子の発現を促進するものを言う。前記したように、植物細胞において働く大抵のプロモーターは、組織特異的プロモーターと呼ばれるものも含め、カルスで活性を示す。従って、プロモーター1としては、これの制御下におく目的遺伝子を発現させようとする植物組織を基準に、この植物組織で活性を示すプロモーターを選択して使用すればよい。

#### 【0017】

また、プロモーター2に関しては、少なくともカルスにおいて活性を示し、その制御下にある遺伝子の発現を促進するものを言う。また、プロモーター3は、プロモーター1及びプロモーター2が活性を示さない植物組織において活性を示すプロモーターを言う。

#### 【0018】

なお、かかるベクターにおいて、プロモーター1として、花芽分裂細胞及びカルスにおいて活性を示し、芽の分裂細胞において活性を示さないプロモーター、プロモーター2として、少なくともカルスにおいて活性を示し、芽の分裂細胞において活性を示さないプロモーター、プロモーター3として、少なくとも芽の分裂細胞において活性を示すプロモーターを用い、かつ、プロモーター1の制御下に置く目的遺伝子として細胞機能阻害遺伝子を用いることにより、不稔植物の作出に有用なベクターを得ることができる。

#### 【0019】

この場合において、プロモーター1、即ち、花芽分裂細胞及びカルスにおいて活性を示し、芽の分裂細胞において活性を示さないプロモーターとしては、花芽分裂細胞で働く、シロイヌナズナのPISTILLATA (PI)、APETALA1 (AP1)、APETALA2 (AP2)、APETALA3 (AP3)、AGAMOUS (AG)、LEAFY (LFY)、SEPALATA3 (SEP3) 遺伝子の発現を制御するプロモーターや、葯特異的に発現し、葯特異

的に働くことが知られているタバコTA29プロモーターなどを使用できる。また、これらはいずれも、プロモーター2としても使用することができる。

#### 【0020】

また、プロモーター3、即ち、芽の分裂細胞において活性を示すプロモーターとしては、植物のヒストンH3、H4プロモーターや、シロイヌナズナのSHOOT MERISTEMLESS (STM)、CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC) 遺伝子の発現を制御するプロモーターなどを使用できる。

#### 【0021】

さらに、細胞機能阻害遺伝子としては、細胞の機能を損なうタンパクをコードする遺伝子であれば種類を問わないが、従来雄性不稔植物産生に用いられているRNase、プロテアーゼ、DAMメチラーゼやジフテリアトキシン等のサイトトキシンをコードする遺伝子を使用することができる。例えば、本発明の実施例では、細胞機能阻害遺伝子としてBax遺伝子を用いたが、これは、アポトーシスを引き起こす哺乳動物のBaxをコードする遺伝子である。

#### 【0022】

本発明のベクターにおいて、発現抑制配列とこの配列を活性化する発現抑制遺伝子の組合せは、何であっても構わない。典型的には、発現抑制配列としてオペレーター配列を、発現抑制遺伝子としてオペレーター配列結合タンパク質をコードする遺伝子を用いることができる。しかし、この他にも、例えば、所定の塩基配列を有する発現抑制配列とこの配列とはアンチセンスの関係にある発現抑制遺伝子との組合せであっても良い。この場合において発現抑制遺伝子は、発現抑制配列からの発現を、これとはアンチセンスの関係にあるmRNAでブロックすることにより、この発現抑制配列の下流に配された遺伝子の発現を抑制する。つまり、このとき、発現抑制遺伝子は発現抑制配列による発現抑制を機能せしめることとなる。また、このような発現抑制遺伝子による発現抑制配列の活性化は、RNA干渉を利用して行うこともできる。

#### 【0023】

なお、オペレーター配列結合タンパク質をコードする遺伝子としては、大腸菌

由来のラクトースオペロンの使用が、オペレーター配列としては、このラクトースオペロンの認識可能なDNA配列が好ましい。植物由来の遺伝子は、内在性のパラログ遺伝子が目的遺伝子の発現制御に影響を及ぼすおそれがある。また、より効果的にオペレーター配列結合タンパク質をオペレーター配列に結合させるため、このオペレーター配列を並列に2つ以上配してもよい。

#### 【0024】

本発明のベクターは、更に脱離反応触媒酵素遺伝子の発現により前記構成単位Bが脱離するものでなくてはならない。このためには、部位特異的組換え系 (site-specific recombination system) やトランスポゾン等を利用することができる。かかる手法は、例えば、特許第3256952号等に記載されており、既に当業者に公知となっている。

#### 【0025】

本発明の実施例においては、脱離反応触媒酵素遺伝子として部位特異的組換え系の組換え酵素遺伝子を用い、構成単位B全体を、この組換え酵素遺伝子が認識し、しかも互いに同じ方向を向いている2つの認識配列に挟むことによって、構成単位Bの脱離を可能とした。

#### 【0026】

ここで、部位特異的組換え系とは、組換え酵素と、この組換え酵素が認識して作用する認識配列との働きにより、この認識配列に挟まれた領域の脱離又は組換えを起こす系である。即ち、この認識配列が同一DNA分子上に、同一方向を向いてある一定の間隔で二つ存在している場合には、これに挟まれた領域がこのDNA分子から脱離し、また、この配列が対向する方向を向いて二つ存在している場合には、この領域が反転するので、本発明では、この前者の脱離作用を利用する。

#### 【0027】

現在、部位特異的組換え系はファージ、細菌（例えば大腸菌）、酵母等の微生物から分離されたCre/lox系、R/R<sub>S</sub>系、FLP/FRT系、cer系、fim系等が知られているが（総説として、N. L. Craig、Annu. Rev. Genet.、22:17、1988）、植物その他の高等生物ではま

だその存在を知られていない。しかし、これらの微生物から分離された部位特異的組換え系も、その由来する生物種と異なる生物種（植物を含む）に導入された場合に、そのそもそもの生物内における挙動と同一の挙動をとることが明らかとなっている。これらの中でも、酵母（*Zygosaccharomyces rouxii*）の部位特異的組換え系である R/R S 系（H. Matsuzaki et al.、J. Bacteriology、172:610、1990）は、脱離効率が高いので、本発明において用いる部位特異的組換え系として好ましい。

#### 【0028】

本発明のベクターにおいては、さらに、これらの遺伝子以外の選抜マーカー遺伝子や、DNA 結合領域をコードする DNA 配列、または不活性化ドメインをコードする DNA 配列等を配してもよい。

#### 【0029】

選抜マーカー遺伝子としては、抗生物質耐性遺伝子や除草剤耐性遺伝子など、汎用のものが使用できる。例えば、このような遺伝子として、カナマイシン耐性遺伝子（NPTII）、抗生物質ハイグロマイシンに対する耐性を植物に付与するハイグロマイシンホストランスフェラーゼ（htp）遺伝子及びビアラホス（bialaphos）に対する耐性を付与するホスフィノスリシンアセチルトランスフェラーゼ（bar）遺伝子等から選ばれる 1 つ以上の遺伝子を使用することができる。このような選抜マーカー遺伝子を本発明のベクター中に組込むことは、目的とする形質転換細胞の効率的な選抜のために有効である。

#### 【0030】

特に構成単位 B に、負の選抜マーカー遺伝子として植物ホルモン合成遺伝子、例えばサイトカイニン合成する酵素をコードするイソペンテニルトランスフェラーゼ（ipt）遺伝子、オーキシシン合成する酵素をコードするインドールアセトアミドヒドロキシラーゼ（iaaH）遺伝子などの植物ホルモン合成遺伝子や、植物ホルモンのシグナル伝達に関与する msh1、ckil などの遺伝子を導入し、利用すると、この構成単位 B の脱離の有無を、植物組織又は器官の奇形の発生の有無として肉眼で検出することができるので、本発明の方法を効率的に

実施することができる。

#### 【0031】

なお、一般に、導入遺伝子は、宿主植物のゲノム中、様々な位置に導入され、その導入位置によって異なる発現を示すことが知られ、位置効果と呼ばれている。本発明のベクターに恒常的に発現する適当なプロモーターとレポーター遺伝子、例えば、 $\beta$ -グルクロニダーゼ（GUS）やルシフェラーゼ（LUC）をコードする遺伝子等の融合遺伝子を組込むことは、この位置効果により、目的遺伝子等の導入遺伝子がより効果的に発現している形質転換体の選抜に有効である。

#### 【0032】

また、植物体内で外来遺伝子などを発現させるためには、構造遺伝子の下流に植物用のターミネーターなどを配置させる必要がある。本明細書において、単に遺伝子というときは、構造遺伝子及びそのターミネーター配列を指している。上記した構成単位A及びBを形成する各遺伝子にしてもその構造遺伝子の下流にターミネーター配列を有するものである。なお、ターミネーター配列としては、例えばカリフラワーモザイクウイルス由来やノパリン合成酵素遺伝子由来のターミネーターなどが挙げられる。但し、植物体内で機能することが知られているターミネーターであればこれらのものに限定されるものではない。

#### 【0033】

##### （2）本発明のベクターの植物宿主への導入

本発明のベクターは、公知の遺伝子工学的手法を用いて宿主植物の細胞に導入することができる。導入方法としては、アグロバクテリウム感染法などの間接導入法や、パーティクルガン法、ポリエチレングリコール法、リボソーム法、マイクロインジェクション法などの直接導入法などが挙げられる。アグロバクテリウム感染法を用いる場合、以下のようにして本発明のベクターをアグロバクテリウムに導入すればよい。

#### 【0034】

まず、本発明のベクターを、定法により、植物細胞用のクローニングベクターに挿入することにより、植物への遺伝子導入用組換えベクターを得る。このときクローニング用ベクターとしては、pBI2113 Not、pBI2113、p

BI101、pBI121、pGA482、pGAH、pBIG等のバイナリーベクター系のプラスミドや、pLGV23Neo、pNCAT、pMON200などの中間ベクター系のプラスミドを用いることができる。なお、前記したように、このとき、本発明のベクターを構成する構成単位A及びBは同一のプラスミドに挿入しても、異なるプラスミドに挿入してもよい。

#### 【0035】

例えば、バイナリーベクター系プラスミドを用いる場合、上記のバイナリーベクターの境界配列(LB, RB)間に、本願発明のベクターの構成単位A及び／又はBを挿入し、この組換えベクターを大腸菌中で増幅する。次いで、増幅したベクターをアグロバクテリウム・チュメファシエンスC58、LBA4404、EHA101、C58C1RifR、EHA105等に、凍結融解法、エレクトロポレーション法等により導入し、該アグロバクテリウムを植物の形質導入用に用いる。

#### 【0036】

上記の方法以外にも、本発明においては、三者接合法[Nucleic Acids Research, 12:8711(1984)]によって本発明の遺伝子を含む植物感染用アグロバクテリウムを調製することができる。すなわち、目的遺伝子を含むプラスミドを保有する大腸菌、ヘルパープラスミド(例えばpRK2013など)を保有する大腸菌、及びアグロバクテリウムを混合培養し、リファンピシリン及びカナマイシンを含む培地上で培養することにより植物感染用の接合体アグロバクテリウムを得ることができる。

#### 【0037】

本発明において、宿主となる植物の種類に制限はない。例えば、シロイヌナズナ、タバコ、イネ、トウモロコシ、ポプラ、ユーカリ、スギなどを宿主とすることができる。遺伝子導入処理は、これらの植物の培養細胞、植物体全体、器官(例えば葉、花卉、茎、根、根茎、種子等)、又は組織(例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束等)のいずれをも対象として行うことができる。植物培養細胞、植物体、植物器官又は植物組織に遺伝子導入処理を行う場合、本発明のベクターは、アグロバクテリウム感染法、パーティクルガン法、又はポリエチレングリ

コール法などによって導入し、植物宿主を形質転換することができる。あるいはプロトプラストにエレクトロポレーション法で導入して形質転換体を作製することもできる。なお、ここで形質転換体とは、本発明のベクターにより目的遺伝子が導入された細胞からなる植物体全体、植物器官又は植物組織をいう。

#### 【0038】

##### (3) 形質転換体の作出

本発明において遺伝子導入処理後の植物細胞は、まず、適当なカルス誘導培地にて培養し、カルスを増殖させる。これにより、カルスにおいて活性を示すプロモーター 2 の働きにより、発現抑制遺伝子が発現して、発現抑制配列の機能を活性化せしめ、目的遺伝子及び脱離反応触媒酵素遺伝子の発現は抑制される。従って、カルス中において目的遺伝子が発現することはない。

#### 【0039】

次いで、このカルスを適当な再分化培地に移植し、プロモーター 3 が活性を示す植物組織又は器官を再分化させる。かかる組織や器官においては、プロモーター 1 及びプロモーター 2 は活性を示さないので、目的遺伝子が発現することはない。脱離反応触媒酵素遺伝子の発現が発現抑制配列によって妨げられることはない。従って、脱離反応触媒酵素遺伝子が発現し、構成単位 B が脱離する。

#### 【0040】

目的とする形質転換体は、この後、目的遺伝子を発現させようとする組織又は器官を再分化させることにより得られる。このとき、構成単位 B は既に脱離してしまっているので、目的遺伝子の発現が、発現抑制配列に妨げられることはない。

#### 【0041】

即ち、本発明のベクターによれば、遺伝子導入処理後の細胞を培養し、この細胞から、カルスを経由して植物組織又は器官を再分化させるだけで、目的遺伝子のカルスにおける発現を抑制しつつ、形質転換体を作出することができる。

#### 【0042】

特に、プロモーター 1 が、少なくとも花芽分裂細胞及びカルスにおいて活性を示し、芽の分裂細胞において活性を示さないプロモーター、プロモーター 2 が、



少なくともカルスにおいて活性を示し、芽の分裂細胞において活性を示さないプロモーター、プロモーター 3 が、少なくとも芽の分裂細胞において活性を示すプロモーター、更に、目的遺伝子が細胞機能阻害遺伝子である場合には、遺伝子導入処理後の植物細胞を培養してカルスを増殖させ、次いで、このカルスから芽を再分化させてから、花芽の再分化が起こるようにするようにすれば、細胞機能阻害遺伝子がカルス増殖中に発現することではなく、花芽の再分化が始まった時点で発現し、花芽の分裂細胞を死に到らしめて花芽形成を阻害するので、不稔植物を得ることができる。再分化した芽から花芽、正確には花芽の原基を得るには、この芽を伸長させて切り取り、次いで、これを適当な発根培地に挿しつけて発根させることで幼植物体を再生し、この幼植物体を生長させて花芽の再分化が起こるようにすればよい。

#### 【0043】

なお、植物細胞からのカルス増殖に用いるカルス誘導培地、カルスからの植物組織や期間の再分化に用いる再分化培地は、植物の組織培養培地として公知の培地に、サイトカイニンやオーキシン等の植物ホルモン等を適宜添加することによって調製することができる。また、選抜マーカー遺伝子として、前記したような抗生物質耐性遺伝子や農薬耐性遺伝子を用いた場合には、形質転換体の選抜のため、これらの耐性遺伝子に対応する抗生物質や農薬を培地中に添加すればよい。

#### 【0044】

##### (4) 形質転換体の検出と確認

本発明のベクターにより作出された形質転換体の検出、及び、その後代における安定性の確認は、これらの細胞や組織から常法に従ってDNAを抽出し、公知のPCR法又はサザン分析を用いて遺伝子を検出することにより行うことができる。

#### 【0045】

また、本発明のベクターにより導入された目的遺伝子が、不稔形質の付与等、植物体の外形に影響を及ぼすものである場合には、遺伝子導入処理後の植物細胞から、最終的に幼植物体を再生して、あるいは、この幼植物体を更に生長させ、その外形を調べることによって形質転換体を検出し、確認することもできる。例

えば、本発明のベクターにより、不稔植物を作出させた場合には、前記のようにして得られた幼植物体を、メトロミックス 350 等の培養土を入れた植木鉢に植えて生長させ、一定期間経過後の花芽の形成を調べることによって形質転換体を検出し、確認することができる。

#### 【0046】

##### 【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

#### 【0047】

##### [実施例 1]

##### 1. P I プロモーターの分離

花芽分裂細胞及びカルスにおいて活性を示し、芽の分裂細胞において活性を示さないプロモーターとして、シロイヌナズナの P I S T I L L A T A (P I) を使用した。京都大学化学研究所の後藤弘爾博士（現岡山県立大学）より P I プロモーターと G U S 遺伝子との融合遺伝子をもつバイナリーベクターを譲り受けた。

#### 【0048】

##### 2. P I プロモーターのタバコでの発現

シロイヌナズナ由来の P I プロモーターは、シロイヌナズナでの活性は報告されている（Gotoら、Genes & Development, vol. 8, p. 1548-1560, 1994）が、このプロモーターがシロイヌナズナと同様な活性をタバコで示すかどうか調査した。

#### 【0049】

上記記載の P I プロモーターと G U S 遺伝子の融合遺伝子をもつ組換えプラスミドを、エレクトロポレーション法により、アグロバクテリウム・ツメファシエンス（*Agrobacterium tumefaciens*）EHA105 に導入した。

#### 【0050】

この *A. tumefaciens* を抗生物質カナマイシン（50mg/l）を

含むLB培地で28℃、一晚培養した。無菌状態で種子発芽から約4週間生育させたタバコ (*N. tabacum* SR-1) の葉を5mm角に切断し、*A. tumefaciens* の培養液に葉の表皮が下になるようにして、1~3分間浸漬させた。次に、滅菌した紙タオル等で葉片に付着している培養液を除き、カルス誘導培地 (MS無機塩、3%しょ糖、0.8%寒天、1mg/lナフタレン酢酸、0.1mg/lベンジルアデニン) に置床し、25℃連続照明下で培養した。3日後、シュート形成用培地 (MS無機塩、3%しょ糖、0.25%ゲランガム、0.1mg/lナフタレン酢酸、1mg/lベンジルアデニン、100mg/lカナマイシン、500mg/lカルベニシリン) に移し、さらに培養を続けた。約4週間後、分化してきた茎葉を切り取り、100mg/lカナマイシンと500mg/lカルベニシリンを含むMS基本培地の入った培養ビン (40φ×130mm) に移植した。

#### 【0051】

さらに、約4週間後、発根した個体はバーミキュライト (日本耐火工業社) / ピートモス (和泉農材) を1:2に混合した用土を含むポットに植え換え25℃の温室で生育させ、PIプロモーター::GUS融合遺伝子を持つ形質転換タバコを作出した。作用した融合遺伝子を持つ形質転換タバコの組織、花芽、花器官、茎頂点、茎、葉および根、またカルスを切り取り、Jeffersonらの染色液 (Plant Mol. Biol. Rep., vol. 5, p. 387-405, 1987) に浸し、37℃で一晩放置した。その結果、タバコにおいて、アラビドプシスPIプロモーターは花芽形成初期の花芽分裂細胞と雄しべとカルスで強い発現が見られ、このプロモーターがこれらの組織において活性を示すことが確認された。

#### 【0052】

### 3. 細胞機能阻害遺伝子の分離

細胞機能を阻害する遺伝子としては、植物において高発現させると細胞を死滅させることが報告されているヒト由来のBax遺伝子をPCR法で分離した (Lacommeら、PNAS, vol. 96, p7956-7961, 2000)。このBax遺伝子は細胞のエネルギー生産を司るミトコンドリアの機能を損

なう働きがある。DDBJから得られたBax遺伝子の配列を基に、hBAX1プライマー (AGGCCCCGGG GGGAGCGGCG GTGATGGCG: 配列番号1) とhBAX2プライマー (CAGAGCTCTG CCATAATTTA TGGAGGAAAA: 配列番号2) を合成した。hBAX1プライマーは制限酵素SmaIの、hBAX2プライマーは制限酵素SacIの認識部位を含んでいる。このプライマーを用いてヒト脳由来のcDNAライブラリー (タカラバイオ社製) を鋳型として、TaKaRa LA PCR Kit Ver 2.1 (タカラバイオ社製) を用い、PCR反応を行った。その結果、ヒトBax遺伝子と推定される650bpのDNA断片の増幅が、アガロース電気泳動で確認できた。このDNA断片を回収し、一部を取り分けてその塩基配列をシーケンサー (Beckman, CEQ200XL) で調べたところ、ヒトBax遺伝子と完全に一致した。

#### 【0053】

#### 4. 特殊配列を用いたPIプロモーターとヒストンプロモーターのカルスでの発現抑制

前述のようにPIプロモーターはタバコカルスで働くため、Bax遺伝子がカルスで発現すると細胞死に繋がる。そこで、カルスでの発現を抑制する目的で、大腸菌のLacI遺伝子産物が認識し、結合するオペレーターと呼ばれる特殊配列を作成した。すなわち、2種類のリン酸化処理したオリゴDNA、-GATC CATTGT GAGCGCTCAC AATACGTATT GTGAGCG CTC ACAAT- (配列番号3) と-GATCATTGTG AGCGCT CACA ATACGTATTG TGAGCGCTCA CAATT- (配列番号4) を合成し、94℃から徐々に室温まで低下させるアニーリング処理により二本鎖DNAとした。5'側と3'側は制限酵素BamHIの突出部位を形成する。この合成二本鎖DNAをPIプロモーターとBax遺伝子の間に挟み込むように連結した (図2 (A))。このオペレーター配列に、LacI遺伝子産物が結合するとBax遺伝子は発現が抑制されることとなる。

#### 【0054】

一方、このオペレーター配列に結合するタンパク質をコードする発現抑制遺伝

子 *LacI* も別途 *PI* プロモーターに連結した。

#### 【0055】

#### 5. 部位特異的組換え酵素遺伝子を利用した脱離カセット及び本発明のベクターの構築

発現抑制遺伝子 *LacI* の発現は、上記のように、カルスで *Bax* 遺伝子の発現を抑制するために必要であるが、花芽で *Bax* 遺伝子を発現させるためには不用となる。そこで、*PI* プロモーターに連結された発現抑制遺伝子 *LacI* が、醤油酵母 (*Zygosaccharomyces rouxii*) 由来の部位特異的組換え酵素 *R* の認識配列 *RS* に挟まれたカセットを構築し、このカセットの脱離が、芽の再分化によって起こるようにした。即ち、芽の分裂細胞で活性を示すユーカリ由来のヒストンプロモーター、*LacI* 遺伝子産物が認識し、結合するオペレーター配列及び組換え酵素 *R* の遺伝子をこの順で連結して、これらを上記 *PI* プロモーターに連結された *LacI* 遺伝子と同じカセット上に配し、*R* 遺伝子をの発現を、ヒストンプロモーターとオペレーター配列によって制御し、*PI* プロモーターが活性化するカルスにおいて *LacI* 遺伝子が発現している間は *R* 遺伝子が発現せず、芽が再分化することによって *PI* プロモーターが不活化すると *LacI* 遺伝子の発現が抑制されて *R* 遺伝子が発現し、このカセットが脱離するようにした (図2 (C))。上記 *LacI* 遺伝子産物が認識するオペレーター配列は、2種類のオリゴDNA、  
—CTAGAATTGT GAGCGCTC  
AC AATACGTATT GTGAGCGCTC ACAAT— (配列番号  
5) と—CTAGATTGTG AGCGCTCACA ATACGTATTG  
TGAGCGCTCA CAATT— (配列番号6) をアニーリングにより二本鎖DNAとしたものを用いた。このオペレーター配列は、上記4で作成し、*PI* プロモーターと *BAX* 遺伝子の間に挿入したオペレーター配列と、その5'側及び3'側が制限酵素 *XbaI* の突出部位を形成していることのみ異なっている。

#### 【0056】

上記 *PI* プロモーター、*LacI* 遺伝子、ヒストンプロモーター、オペレーター配列及び *R* 遺伝子は、認識配列 *Rs* に挟まれたカセット内の、制限酵素 *Hin*

d I I IとE c o R Iサイトに挿入されている(図2 (C))。

#### 【0057】

#### 6. 植物導入用ベクターの構築

上記のP Iプロモーター、オペレーター配列及び細胞機能阻害遺伝子B a xの構築物(P I::O::B a x)、即ち構成単位A(図2 (A))、並びに、P Iプロモーター、転写抑制遺伝子L a c I(P I::L a c)、ヒストンH3プロモーター、オペレーター配列及び部位特異的組換え酵素遺伝子R(H3::O::R)が認識配列R sに挟まれた構築物、即ち構成単位B(図2 (C))を連結し、植物遺伝子導入用ベクターp B I 1 2 1のR BサイトとL Bサイトの間に挿入して、本発明のベクターを挿入した植物への遺伝子導入用ベクター、p M S-B a x 1(独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター宛に、平成15年4月4日付で国際寄託済み。)を得た(図2 (B))。

#### 【0058】

#### 7. p M S-B a x 1のタバコへの導入

p M S-B a x 1を、エレクトロポレーション法により、アグロバクテリウム・ツメファシエンス(*Agrobacterium tumefaciens*) E H A 1 0 5に導入した。このA. *tumefaciens*を抗生物質カナマイシン(50mg/l)を含むL B培地で28℃、一晚培養した。一方、無菌状態で種子発芽から約4週間生育させたタバコ(*N. tabacum* S R-1)の葉を5mm角に切断し、これをp M S-B a x 1導入A. *tumefaciens*の培養液に葉の表皮が下になるようにして、1~3分間浸漬させた。次に、滅菌した紙タオル等で葉片に付着している培養液を除き、カルス誘導培地(M S無機塩、3%しょ糖、0.8%寒天、1mg/lナフタレン酢酸、0.1mg/lベンジルアデニン)に置床し、25℃連続照明下で培養した。3日後、シュート形成用培地(M S無機塩、3%しょ糖、0.25%ゲランガム、0.1mg/lナフタレン酢酸、1mg/lベンジルアデニン、100mg/lカナマイシン、500mg/lカルベニシリン)に移し、さらに培養を続けた。

#### 【0059】

約4週間後、分化してきた茎葉を切り取り、培養ビン(40φ×130mm)

に入った発根培地 (MS 基本培地、100 mg / l カナマイシン、500 mg / l カルベニシリン) に挿しつけた。さらに、約 4 週間後、発根した個体はバーミキュライト (日本耐火工業社) / ピートモス (和泉農材) を 1 : 2 に混合した用土を含むポットに植え換え 25 °C の温室で生育させ、形質転換タバコを得た。

#### 【0060】

#### 8. 花芽組織の形態

上記のようにして得られた形質転換タバコにおける花芽の形態を観察した結果、12 個体中 5 個体で花芽組織の死滅が確認できた (図 3)。また、花芽組織が死滅し、不稔化したと考えられるタバコの葉から、常法によりゲノム DNA を抽出し、組換え酵素遺伝子 R、組換え酵素認識配列 R s 及び細胞機能阻害遺伝子 B a x を識別できる特異的プライマーを用いて PCR 行い、増幅遺伝子を電気泳動分析に供することにより導入遺伝子の存在を調査した。図 4 に示すように、各形質転換体の葉では R s と B a x 遺伝子の存在は確認できたが、R 遺伝子は検出できなかった。また、図 5 に示すように、この花芽組織が死滅した系統のタバコは、遺伝子導入処理後増殖したカルスでは L a c I 遺伝子は発現し、僅かながら R 遺伝子の発現も確認できた。しかしながら、このカルス、及び、その後に再分化してきた芽においては、B a x 遺伝子の発現は確認できなかった。

#### 【0061】

以上のことから、このベクター pMS-B a x 1 は、これが導入されたタバコにおいて、図 6 に示すように機能したと考えられる。すなわち、遺伝子導入処理後増殖したカルスでは P I プロモーターが活性を示すため、発現抑制遺伝子 L a c I が発現して L a c I 遺伝子産物がオペレーター配列に結合し、B a x 遺伝子と R 遺伝子は発現できない。しかし、芽が分化する際は、P I プロモーターが不活化し、L a c I タンパクが発現しなくなる。このため、芽の分裂細胞において活性を示すヒストン H 3 プロモーターにより R 遺伝子の発現が促進され、R s 認識配列に挟まれたカセットが脱離する。さらに、このカセットが脱離した花芽の分裂細胞では、P I プロモーターが再び活性化するので、B a x 遺伝子の発現が促進されて細胞死が誘導されるのである。

#### 【0062】

## [実施例 2]

1. ipt 遺伝子を負の選抜マーカー遺伝子とする発明のベクターの構築

構成単位 B に負の選抜マーカー遺伝子として、サイトカイニン合成酵素をコードする ipt 遺伝子を導入した。

## 【0063】

即ち、図 2 (E) に示すように、35S プロモーターに連結した ipt 遺伝子を含み、両端に HindIII サイトをもつ DNA 断片を構成単位 B に挿入した。これを構成単位 A (図 2 (A)) とともに植物遺伝子導入用ベクター pBI121 の RB サイトと LB サイトの間に挿入して、本発明のベクターを挿入した植物への遺伝子導入用ベクター、pMS-Bax1-ipt を得た (図 2 (D))

。

## 【0064】

このベクターは、すでにカナマイシン耐性遺伝子などの選抜マーカー遺伝子と共に有用遺伝子が導入されている植物体を本発明の方法によって不稔化するために有用である。

## 【0065】

2. pMS-Bax1-ipt のタバコへの導入

35S プロモーターと Nt1im1 のアンチセンス cDNA を連結した融合遺伝子を、カナマイシン耐性遺伝子を選抜マーカーとして導入したタバコ (Kawakura, Plant J., 22, 289-301, 2000) に、上記 pMS-Bax1-ipt を更に導入した。

## 【0066】

即ち、pMS-Bax1-ipt を、エレクトロポレーション法により、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 に導入した。この *A. tumefaciens* を抗生物質カナマイシン (50 mg/l) を含む LB 培地で 28℃、一晚培養した。一方、上記融合遺伝子が導入されたタバコ A2 (*N. tabacum* SR-1) を、無菌状態で種子発芽から約 4 週間生育させてから、葉を採取して 5 mm 角に切断し、これを pMS-Bax1-ipt 導入 *A. tumefaciens* の



培養液に葉の表皮が下になるようにして、1～3分間浸漬させた。次に、滅菌した紙タオル等で葉片に付着している培養液を除き、カルス誘導培地（MS無機塩、3%しょ糖、0.8%寒天、1mg/lナフタレン酢酸、0.1mg/lベンジルアデニン）に置床し、25℃連続照明下で培養し、更に3日後、ホルモンフリー培地（MS無機塩、3%しょ糖、0.25%ゲランガム、500mg/lカルベニシリン）に移し、培養を続けた。

#### 【0067】

約4週間後、pMS-Bax1-iptの構成単位Bに導入したipt遺伝子の発現により茎葉が分化してきたので、この茎葉を切り取り、培養ビン（40φ×130mm）に入った発根培地（MS基本培地、100mg/lカナマイシン、500mg/lカルベニシリン）に挿しつけた。さらに、約4週間後、発根した個体はバーミキュライト（日本耐火工業社）/ピートモス（和泉農材）を1：2に混合した用土を含むポットに植え換え25℃の温室で生育させ形質転換タバコを得た。

#### 【0068】

### 3. 花芽組織の形態

上記のようにして得られた形質転換体における花芽の形態を観察した結果、10個体中4個体で花芽組織が死滅しており、すでにカナマイシンを選抜マーカー遺伝子として作成された形質転換体にも効果的に遺伝子導入できることが確認された。

#### 【0069】

#### 【発明の効果】

本発明は、カスケード的に作用して植物の表現型に効果を及ぼすことができる調節因子および構造遺伝子を含むベクターによって植物を形質転換することにより、植物での遺伝子発現を制御することができる。

#### 【0070】

即ち、本発明によれば、目的遺伝子のカルスでの不要な発現を抑制することができる。従って、本発明によれば、目的遺伝子が、遺伝子が導入されたカルスで過剰に発現し、植物細胞をいたずらに疲弊させたり、芽への再分化を損なうとい

った問題を解決することができる。

【 0 0 7 1 】

特に、本発明は、不稔植物の作出に大きな効果を発揮する。

【 0 0 7 2 】

【配列表】

< 1 1 0 > Nippon Paper Industries Co., Ltd.

<120> Vector for Introducing a Gene into a Plant and Method for Producing Transgenic Plants using the Vector

<130> PA-4982083

<160>

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for PCR

<400> 1

aggccccggg gggagcggcg gtgatggcg

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for PCR

<400> 2

cagagctctg ccataattta tggaggaaaa

<210> 3

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> operator

<400> 3

gatccattgt gacgctcac aatacgtatt gtgagcgctc acaat

<210> 4

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> operator

<400> 4

gatcattgtg agcgctcaca atacgtattg tgagcgctca caatt

<210> 5

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> operator

<400> 5

ctagaattgt gagcgctcac aatacgtatt gtgagcgctc acaat

< 2 1 0 > 6

< 2 1 1 > 4 5

< 2 1 2 > DNA

< 2 1 3 > Artificial Sequence

< 2 2 0 >

< 2 2 3 > operator

< 4 0 0 > 6

ctagattgtg agcgctcaca atacgtattg tgagcgctca caatt

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図 1】

本発明のベクター基本的構成を示す説明図である。

##### 【図 2】

pMS-bax1 及び pMS-bax1-ipt の制限酵素地図を示す図である。

##### 【図 3】

実施例 1 において得られたタバコにおいて観察された、死滅した花芽組織の状態を示す写真である。

##### 【図 4】

実施例 1 において、花芽組織が死滅したタバコの葉から抽出されたゲノム染色体 DNA について行った、PCR の結果を示す写真である。

##### 【図 5】

実施例 1 において、花芽組織が死滅した系統のタバコの遺伝子導入処理後のカルス、及び、その後再分化してきた芽から RNA を抽出し、ノーザンハイブリダイゼーションを行った結果を示す写真である。

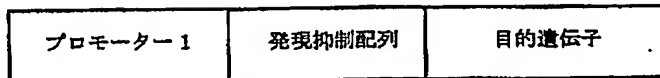
##### 【図 6】

本発明のベクターの機能を示す説明図である。

【書類名】 図面

【図 1】

構成単位 A



構成単位 B

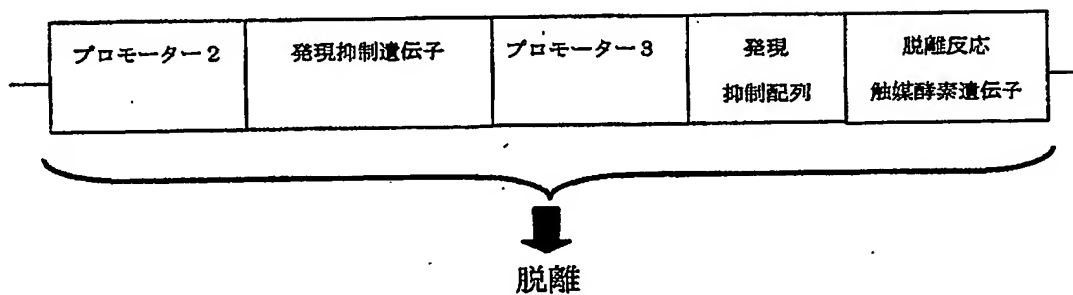


図 1. 本発明のベクターの基本的構成単位

【図2】

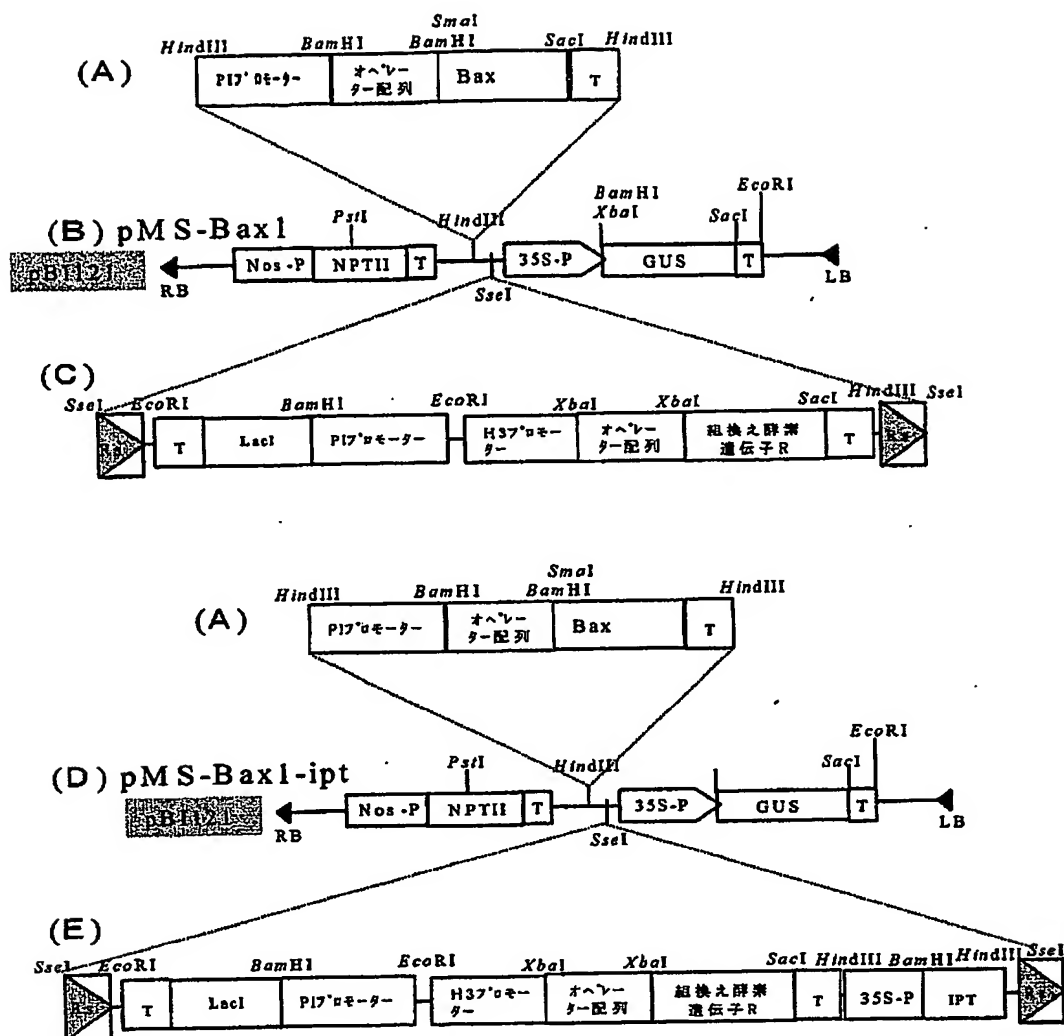


図2. pMS-Bax1及<sup>u</sup>pMS-Bax1-ipt

【図 3】

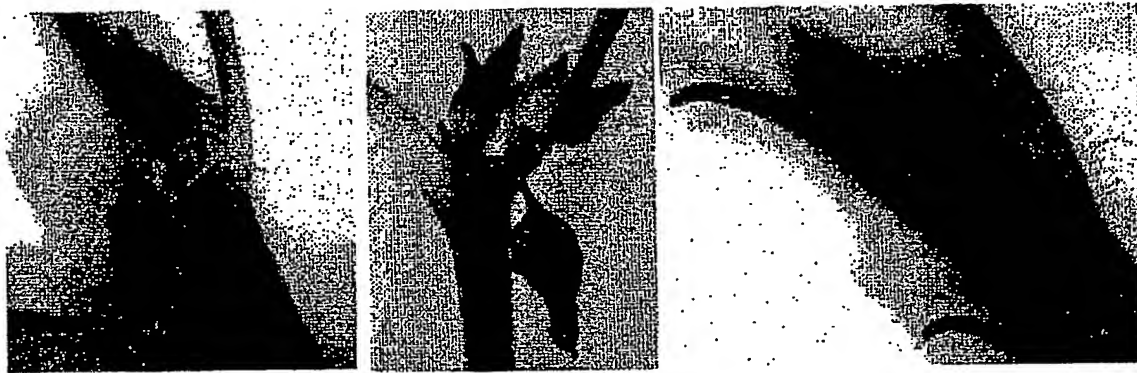


図 3. Bax 遺伝子によって死滅したタバコの花芽組織

【図 4】

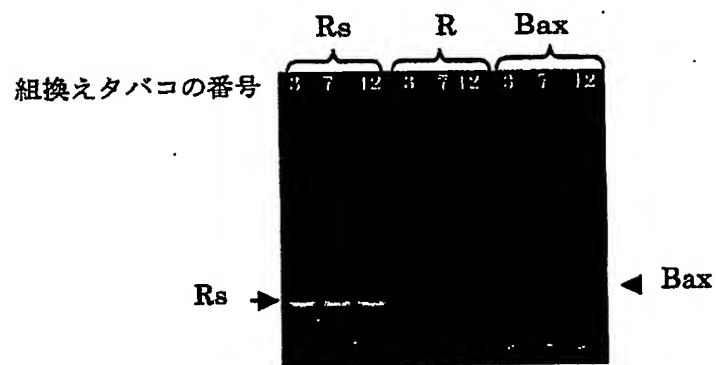


図 4. 花芽組織の死滅したタバコ形質転換体の葉における目的遺伝子の存在



【図 5】

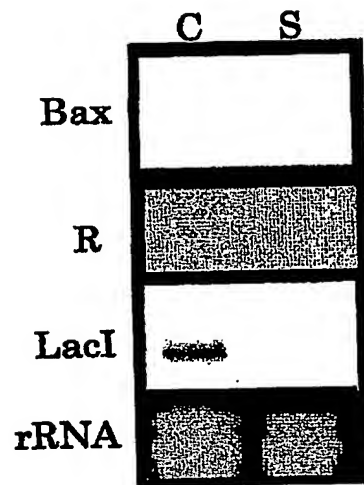


図 5. 花芽組織の死滅した系統のタバコにおける  
遺伝子導入処理後のカルス (C)、  
及び、その後再分化した芽 (S) における各遺伝子の発現

【図 6】

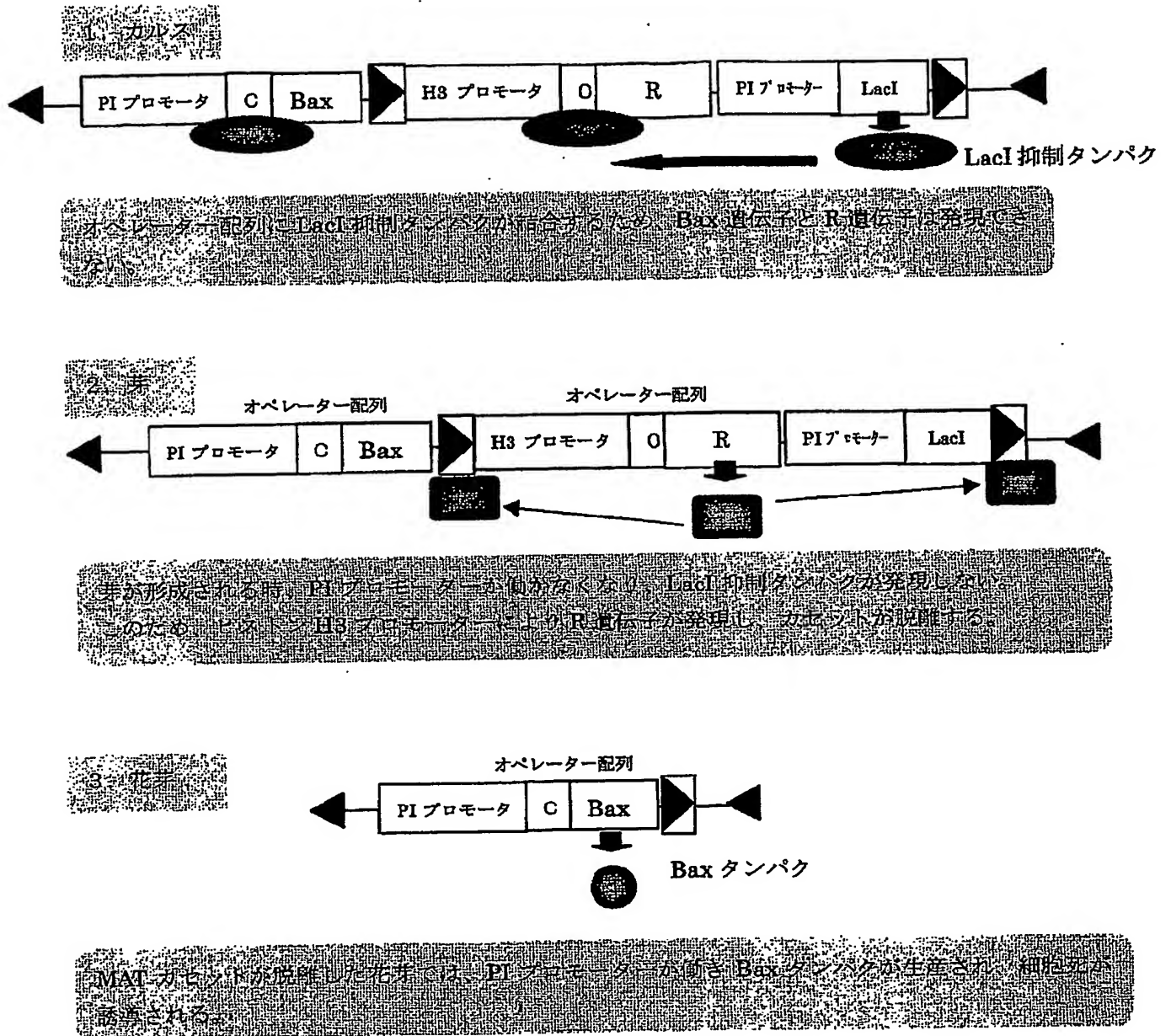


図 6. カルス、芽、花芽における pMS-Bax1 の挙動

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 導入した目的遺伝子のカルスでの過剰な発現を抑制する。また、これによって不稔植物を作成する。

【解決手段】 以下の構成単位A及びBを有するベクターを用いて、植物に遺伝子導入を行う。

A. P1、発現抑制配列、並びに、P1及び発現抑制配列により制御される目的遺伝子からなるDNA配列。

B. P2、P2により制御される発現抑制遺伝子、P3、前記発現抑制配列、並びに、P3及び前記発現抑制配列により制御される脱離反応触媒酵素遺伝子からなり、該脱離反応触媒酵素遺伝子の発現により脱離するDNA配列。

(但し、P1は少なくともカルス及び目的遺伝子を発現させようとする植物組織において活性を示すプロモーター、P2は少なくともカルスにおいて活性を示すプロモーター、P3は少なくともP1及びP2が活性を示さない植物組織において活性を示すプロモーター)

【選択図】 図1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 3 - 1 3 5 1 4 1
受付番号	2 0 3 0 0 6 4 0 0 5 3
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 5 年 5 月 2 8 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成15年 4月 7日

次頁無

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-135141
受付番号	20300640053
書類名	特許願
担当官	兼崎 貞雄 6996
作成日	平成16年 5月 7日

<認定情報・付加情報>

【提出日】 平成15年 4月 7日

特願 2 0 0 3 - 1 3 5 1 4 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 1 8 3 4 8 4 ]

1. 変更新月日

1 9 9 3 年 4 月 7 日

[変更理由]

名称変更

住 所

東京都北区王子 1 丁目 4 番 1 号

氏 名

日本製紙株式会社